

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

1988

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭63-119500

⑫ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)5月24日

C 07 K 15/14
A 61 K 31/725ABL
ABY

8318-4H

7252-4C ※ 等価請求 未請求 発明の数 5 (全13頁)

⑭ 発明の名称 硫酸化多糖体 DS 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

⑮ 特 願 昭62-125443

⑯ 出 願 昭62(1987)5月22日

優先権主張 ⑰ 昭61(1986)5月23日 ⑱ 日本 (J P) ⑲ 特願 昭61-118847

⑳ 発 明 者 井 上 和 弘 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉑ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉒ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉓ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

㉔ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

最終頁に続く

明 細 書

ガラクトース環))

1. 発明の名称

蛋白含量 (%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォ

硫酸化多糖体 DS 4152 並びにこれを含有

リン酸、牛血清アルブミン

する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

標準)

2. 特許請求の範囲

(4) 比旋光度

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質

 $(\alpha)_D^{20} -37^\circ \pm 1^\circ$ (0.5%水溶液)

を有する硫酸化多糖体 DS 4152。

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

(1) 分子量 (ゲルろ過法による)

1240, 840 (肩), 810 (cm^{-1} ; KBr)22000 \pm 3000

(6) 溶解性

(2) 元素分析値

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

には殆ど不溶。

N 0.51~0.59% S 1.06~1.17%

(7) 显色反応

P 0.77~1.06%

(3) 糖および蛋白質の含量

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ビ

糖含量 (%) : 57 ± 3 (フェノール-硫酸法、

ムレット反応およびローリー・フォリン反応

は陽性。水溶液のエルソン・モルガン反応およびムンヒドリッヒン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3% 濃度水溶液)

(9) 構成糖および炭酸基、炭素の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、 SO_3Na

およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

(10) 構成アミノ酸およびアミノ糖

加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、ジアミノピロリン酸、グルコサミンおよびムラニン酸の存在を認める。

次の薬理第5項記載の血管新生抑制剤。

2 炭酸化多糖体 DS 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規な炭酸化多糖体 DS 4152 並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、ミクロコプカス sp. AT-25 の発酵生成物中に腫瘍抑制作用、免疫抑制作用およびインターフェロン誘起作用を有する炭酸化多糖体 DP 4639 が存在することが知られて

2 炭酸化多糖体 DS 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

1 リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児糖尿病に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4 炭酸化多糖体 DS 4152 を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

2 炭酸化多糖体 DS 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

6 ステロイドが糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類から選ばれたものである特許請求の範囲第5項記載の血管新生抑制剤。

7 リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児糖尿病に有効な特許請求の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-25329号)。

本発明者らは、種々の有用性の期待される炭酸化多糖体 DP 4639 について生物学的特性を明らかにすべく検討をこころなつた結果、DP 4639 が強い発癌性を有することを知つた。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発癌性物質を除去すべく、更に研究をこころなつていたところ、DP 4639 は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちの DS 4152 と名づけられた一成分は発癌性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用を有することを見出した。

特開昭63-119500 (3)

更にまた、本発明者は、このDS 4152 とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の知見に基づくものであり、その目的は、新規な免疫化多糖体DS 4152を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、免疫化多糖体DS 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、免疫化多糖体DS 4152とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本明細書中の「血管新生抑制」とは、癌の

発育、実体形成、創傷の治癒等に極めて重要なだけでなく、関節リウマチを含む慢性炎症、免疫応答、腫瘍増殖等の病的状態においてもその病体の進展に深く関与している血管の新生作用を弱めることをいう。したがって、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与する諸疾患、例えばリウマチ性関節炎、増殖性網膜炎、乾癬、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の免疫化多糖体DS 4152は、アルモロパクター sp. AT-25 (工業技術院放生

物工業技術研究所には、Microsome sp. AT-25として、FERM P-5255及びAtrichobacter sp. AT-25としてFERM BP-1357の番号で寄託されている)の培養物から分離されるDF 4639 (特開昭56-67301号参照)から、その中に含まれる分子量約 1.5×10^6 以上の免疫性物質等を通常の分子量分離法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法、アルコール沈殿法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によればDF 4639を通常のゲルろ過媒体、例えば、セファクリル (Sephacryl S-300 (ファルマシア製))を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高速ゲルろ過クロマトグラフィー

(東洋ソーダ製03000 SWカラム使用)を行い、排除限界(ボイド・ボリューム、void volume)にピークを示すフラクション(R面分)とボイド・ボリュームにピークを与えず分子量約 $2 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ の範囲に移出されるフラクション(L面分)をそれぞれ、選別する。

また、限外ろ過は通常の膜(例えばAmicon社製のYM10、YM30、YM50、PM30やMillipore社製のNOVA100、OMEGA100、NOVA50、OMEGA50等特にYM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはペリスタリク(peristaltic)ポンプによつて加圧(0.5~5 kg/cm²程度)し、透過液をDS 4152として採ればよい。使用液は、水-エタ

特開昭63-119500(4)

ノール(10:2~3)または水が適量であり、4で乃至室温で行なうのが一般的である。

得られた各透析内液を蒸留後ろ過し、ろ液を数倍量のエタノール中に浸漬下注ぐことにより生成する白色沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥すれば、目的とするDS 4152(1面分)と発熱性物質(2面分)が各々得られる。

こうして得られるDS 4152は以下に述べる物理化学的諸性質を示す。下記の物性はそのナトリウム塩についてのものである。

(1) 分子量(ゲル法による)

28000 ± 3000

(2) 元素分析値(5ソフトの巾を示す)

ルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(7) 着色反応

フェノール-硫酸、アンスロシン-硫酸、ビュレット反応およびローリー・フォリン反応は陽性。水溶液のエルソン・マルガン反応およびニンヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8(3%炭酸水溶液)

(9) 構成糖および硫酸基、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、 30H_2 およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

C 24.42~25.76% H 3.34~3.96%

N 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(3) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%): 5.7 ± 3 (フェノール-硫酸法、ガラクトース標準)

蛋白含量(%): 1 ± 0.5 (ローリー・フォリン法、牛血清アルブミン標準)

(4) 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} -37^\circ \pm 1^\circ$ (0.5%水溶液)

(5) 紫外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯
1240, 840 (nm), 810 (cm^{-1} ; KBr)

(6) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム

(10) 構成アミノ酸およびアミノ糖

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロアラニン、グルタミン酸、グルコサミンおよびムツニン酸の存在を認める。

以上のDS 4152は、後記実施例で示す如く、単独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイド剤と組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤にかいては、DS 4152の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもできる。

従来、プレドニゾン、コルメチルプレドニゾン、デキサメタゾン等のステロイドホルモンが、婦科疾患、関節炎、アレルギー、ハムステ

一順並に実験的に誘導された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer Res. 39 1305 (1979) J. Hall,

Cancer Inst. 57 789 (1976) 及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 1176 (1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、糖質コルチコイド(プレドニゾン、プレドニソン、ベタメタゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が抗乳癌薬として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている (Oncology 10 72 (1964))。

ゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、フオスフェート、アタルアセテート、テトラヒドロフタレート、トリメタルアセテート等)；メタルプレドニゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート等)；ベタメタゾンおよびその誘導体(フオスフェート、バレレート等)が挙げられる。

また、グルココルチコイドのC-11位の水素置換がα置換になつた異性体(たとえば、11α-エピヘイドロコルチゾン)も含まれるし、前記グルココルチコイドのテトラヒドロ代謝物(グルココルチコイド活性の有無は関係しない)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロゲン類が前立腺癌の治療に用いられている。

前記の02 4152 と組合せ用いることのできるステロイド類は、糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類等であり、より具体的には次のものが例示される。

- (1) プレダニンを母核とするステロイドホルモン、すなわちグルココルチコイドであり、たとえばコーチゾンおよびその誘導体(アセテート、エナンテート、ワンドシレート等)；ヘイドロコーチゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、カプロエート等)；プレドニゾンおよびその誘導体；プレドニ

メドロキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセテート等)；デイドロゲステロンおよびその17α-アセトキシ誘導体(デムファストン)等があげられる。

更にまた、メナロコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセテート、トリメタルアセテート、エナンテート、フェニルプロピオネート等)もあげられる。

- (2) アンドロステンを母核とするステロイドホルモン、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンテート、アタレート、カプリレート等)があげられる。また、エピテストノールおよび

その誘導体、ヒドロコルチゾンがあげられる。

さらにフルオキシメステロンおよびその誘導体、メテラステロンおよびその誘導体、ステノロンおよびその誘導体も含まれる。

(3) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、妊娠ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体(ベンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、ウンデセノエート等)、エストリオールおよびその誘導体(トリプロピオネート等)があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の剤型としては、有効成分を医薬的に許容される担体、賦形剤を含有する種々の形態、例えば水または各種の増液用製剤に溶解させた液剤、散剤、錠剤

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が適量である。

また、本発明の血管新生抑制剤を抗腫瘍剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

(発明の効果)

本発明のDS 4152 はそれ単独であつても血管新生抑制作用を奏するが、これを更にステロイド剤と組合せるとより優れた血管新生抑制作用を奏する。

したがつて、DS 4152 単独であつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と組合せたものは相乗的に作用が増強されるので、例えば腫瘍血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として特

別、良剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤がDS 4152 とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記用途の単剤に調製して組合せ剤とすることも、あるいは両成分を混合剤とし製剤化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、静脈内、動脈内、経口、皮下、直腸内、粘膜内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、DS 4152 として1~2000mg程度であり、ステロイド類は男性ホルモン剤、経口コルチコイド剤で10~1000mg、通常30~60mgが適量で、漸減していくのが好ましいことがある。プロゲステロン剤では100~1200mgが適量

に有用なものである。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(a)

特開昭58-67301号に記載の方法により得られたDP 4639(50%)を15mlの0.1M NaClに溶解し、これを0.1M NaClで平衡化したカラム(セファクリルS-300; 50×80cm)にかけて同形塩にて溶出し、18mlずつ溶出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲル透過クロマトグラフイー(東洋ソーダ製 93000 SWカラム、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5)を行い、ポイド・ポリュームにピークを与えず、

特開昭63-119500(7)

DS 4152 の物理化学的性質および生物学的性質を DP 4639 と比較して示す。

(a) 糖、蛋白、S および P 含量 (第 1 表)

第 1 表

	1) 糖 (%)	2) S (%)	3) 蛋白 (%)	4) P (%)
DS 4152	56	1.1	1.1	0.86
DP 4639	54	1.08	1.3	0.86
H 成分	42	7.9	7.6	0.72

- 1) フェノール-硫酸法 (ガラクトース換算)
- 2) アントノビチス法 (C.A. Antonopoulos, Acta Chem. Scand. 16, 1521 (1962)) による
- 3) ローリー・フォリン法 (牛血清アルブミン換算)
- 4) チエンらの方法 (P.S. Chen et al., Anal. Chem. 28, 1756 (1956)) による

分子量 (ゲストラン標準) が約 2×10^4 ~ 8×10^4 の範囲に抽出されるフラクションを集め (約 700 ml)、脱イオン水に対して透析した。透析内液を約 50 ml で濃縮後ろ過した。ろ液を約 400 ml のエタノール中へ投下して、生成した沈殿を集め、これを 90% エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥 (50℃, 6 時間) して目的物の DS 4152 の白色粉末 3.6 g を得た。

一方、上記高濃ゲル透過クロマトグラフィーでボイド・ボリュームにピークを与えるフラクションを集め (約 90 ml)、上述の DS 4152 の場合と同様に処理して、H 成分を黄色粉末として 0.18 g を得た。

(b) ガラクトース、グルコース、炭酸糖および糖の構成モル比

試体を 1 規定塩酸中 100℃ で 5 時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルジトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、炭酸糖および糖のモル比は、S および P の含量 (%) から算出した。

第 2 表

	ガラクトース	グルコース	炭酸糖	糖
DS 4152	0.1	1.0	7.3	0.6
DP 4639	0.2	1.0	7.3	0.6
H 成分	0.2	1.0	0.9	0.6

第 2 表は、グルコースを 1.0 モルとした場

合の各成分のモル比の 1 例である。

(c) 構成アミノ酸およびアミノ糖の同定

DS 4152 を 3 規定塩酸中、100℃ で 16 時間加水分解した後、常法によりアミノ酸分析計にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、ジアミノピリン酸、グルコサミンおよびムラミン酸のピークを認めた。

(d) 比旋光度: $(\alpha)_D^{20}$ (c=0.5, 水)

第 3 表

	比旋光度
DS 4152	-37
DP 4639	-36
H 成分	-34

(e) ゲル透過層出パターン

第 1 図、第 2 図および第 3 図に、それぞれ

特開昭63-119500 (B)

あると推定される。

(i) 発熱性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行つた発熱性試験の結果を第4表に示す。

以下余白

DS 4152、DP 4639 およびB部分の高速ゲル透過クロマトグラムを示す(東洋ソーダ製03000 SWカラム使用、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5、0.9 ml/分、標準物質デキストランT-10およびT-40)。

(i) 紫外吸収スペクトル

2 mg/ml水溶液において220~340 nmに極大吸収は認められない。

(ii) 赤外線吸収スペクトル (KBr錠)

1240、840 (肩) および810 cm^{-1} に、酸化多糖に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主としてD-ガラクトースとD-グルコースから成る糖質部分にムライン酸フォスフェートを介してメチルグリカン部の結合した硫酸化多糖体で

第4表

試 体	用量 mg/10ml μ	体積上昇値℃					特 定・
		個 別					
DS 4152	75	0.20	0.10	0.15	0.45	—	
	375	0.20	0.80	0.20	0.90		
DP 4639	15	1.85	1.25	1.40	4.20	+	
	75	1.40	2.00	1.80	5.20	+	
B部分	15	1.90	1.40	2.20	5.50	+	
	75	1.80	1.75	2.65	6.20	+	

・+ (陽性)、- (陰性)

(i) DS 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、LD₅₀が2000 mg/kg以上であった。

実施例1 (ii)

DP 4639 (60 mg)を300 mlの水-エタノール(10:3)溶液に溶解し、YM10膜(41.8 cm^2 、アICON社製)を用いて、室温で加圧(1.5 kg/ cm^2)下、室温で限外ろ過した。上記ろ過を追加しながら透過液量が約3 Lとなるまで実施した。透過液の濃縮液(約50 ml)に100 mgの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、遠心分離により得られる上清を約500 mlのエタノール中へ沈降下ろした。生成した沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(55℃、5時間)してDS 4152

特開昭63-119500 (9)

の白色粉末33%を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す如く、
蛋白、S及びPの含量を除き、実施例1(A)の
DS 4152 と同一であつた。

糖含量 58%

S含量 11.3%

蛋白含量 0.9%

P含量 0.92%

高速ゲル透過クロマトグラムを第4図に示す
(0.3000 SWカラム、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)、0.8ml/分)。

実施例2

胎胚尿原血管新生阻止試験(直接法)：

胎胚を用い、タイラーとフォークマン

(Nature 297:307,(1962))の方法を—

べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン
を0.5 μ g / 胎胚の量(血管新生に影響のない量)用いた。また、比較として、DP 4639
及びE成分についてもその活性を調べた。こ
の結果を第5表に示す。

第5表

50%血管新生阻止量(ID₅₀値)

	DS 4152	DP 4639	E成分
ID ₅₀ 値 (μ g/胎胚)	3	30	600

実施例4

実施例2と同様な方法で、各種ステロイド
とDS 4152 の併用によるID₅₀値の変化を検討した。この結果、種々のステロイドに10

部改良した以下の方法で行つた。

馬(ノーリングクロス)の4~6日胎受期間
の尿原液に、生理食塩水で溶解したDS 4152
又はヘパリンを加し、37℃で培養した。

高物添加2日後に、尿原液血管の発達度を
生理食塩水のみを加した対照と比較し、ブ
ロビット法により、50%血管新生阻止量
(ID₅₀値)を算出した。

この結果、本発明のDS 4152 のID₅₀値
は、160 μ gであつた。これに対し、ヘパ
リンは、100 μ gでも作用を示さなかつた。

実施例3

胎胚尿原血管新生阻止試験(直接法)：

実施例2と同様にして、ステロイドと

DS 4152 を併用した場合の効果について調

べた。DS 4152 を加えれば、それぞれの胎
胚尿原血管新生阻止活性が16~100倍
に増加することが明らかとなつた(第6表)。

第6表

ステロイド	ID ₅₀ 値(μ g/embryo)	
	単 独	DS 4152 (増加)と併用 (併用)
コルチゾンアセテート	120	Q17 (7.1倍)
ハイドロコルチゾン	110	Q16 (6.9)
プレドニゾン	130	Q08 (16.3)
6 α -メチルプレドニゾン	115	Q03 (38.3)
メチルプレドニゾン	Q60	Q05 (16.0)
テトラヒドロ	100	Q01 (100.0)
プロゲステロン	102	Q49 (2.1)
メトキシプロゲステロンアセテート	112	Q42 (2.7)
17 β -エストラジオール	196	Q28 (7.0)
フルオキシメステロン	124	Q12 (10.3)
5 α -アンドロスタン	232	Q29 (8)

実施例5

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6時間後に血液を採取した。0.313% クエン酸ナトリウムで凝固を阻止し、直接法と同様に5日齢受精鶏膜尿膜に添加し、2日後に判定した。この結果を第7表に示す。

第7表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生阻止率 (%)
経口	3	-59
	30	264
	300	627
皮下	3	16
	30	378
	300	661

第8表

投与ルート	DS 4152	DF 4639	8面分
皮下	922%	833%	868%
経口	927%	868%	828%

DS 4152 および DF 4639 は経口、皮下いずれの経路によつても受精鶏膜血管新生を抑制することが認められた。

実施例7

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

ICR系雄マウスに、生理食塩水に溶解したDS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または筋肉内投与した。投与6時間後に採血し、0.313% クエン

この結果から明らかなように、用量依存的な血管新生抑制作用が認められた。

実施例6

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

実施例5と同様に、ステロイドとDS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン5mg/kgの割合で用い、DS 4152 は30mg/kg又は300mg/kgとなるよう調整して加えた。また、比較としてDF 4639及び8面分を用いた。この結果を第8表に示す。なお、表中の数値は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血液を添加した受精鶏膜血管の発達度を100%とした時の阻止率である。

酸ナトリウムで凝固を阻止し、これを直接法と同様に5日齢受精鶏膜尿膜に加え、2日後に血管新生に及ぼす効果を判定した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウス、6時間経過後の血液を加えた場合の受精鶏膜血管の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果は第9表の通りである。

以下余白

表9

物質名(ルート)	ステロイド		DS 4152投与量 (mg/kg; p.o.)	血中新生胆石率 (%)
	投与量(mg/kg)	投与回数(p.o.)		
コルチゾン	0	0	0	27
コルチゾン	1	0	30	75.1
コルチゾン	0	0	30	-26
コルチゾン	0	0	30	71.7
コルチゾン	0	0	30	-123
コルチゾン	0	0	30	80.7
コルチゾン	0	0	30	40
コルチゾン	0	0	30	53
コルチゾン	0	0	30	184
コルチゾン	0	0	30	234
コルチゾン	0	0	30	242
コルチゾン	0	0	30	376

実施例8

抗腫瘍試験:

CS731 / 6雄マウスに同系の肺癌由美原水腫瘍M5076を 1×10^6 個皮下接種し、5日目よりDS 4152を30mg/kg 1日1回、6回皮下投与したところ、著大な抗腫瘍効果と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第10表に示すように移植21日目の腫瘍平均重量は対照群の37% (63%抑制)であり、かつメチアソン生存日数が対照群より33%延長した。

・腫瘍平均重量は、腫瘍塊の長軸と短軸の長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2 \times \frac{1}{2}$$

実施例9

抗腫瘍試験:

ICR系雄マウス(5週齢)にサルコマ180 (S180)を 1×10^6 個皮下接種し、3日目より酢酸コルチゾンの生理食塩水懸濁液を250mg/kg/日の割合で3日間、100mg/kg/日の割合で1日投与した。DS 4152は生理食塩水に溶解し、0.61もしくは0.1mg/kgとなる様1日1回皮下もしくは経口にて4日間投与した。移植7日目に屠殺して腫瘍重量を対照と比較したところ第11表に示す如く酢酸コルチゾンのみを投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらにDS 4152を投与することにより腫瘍増殖抑制作用が得ら

表10

腫瘍系	群	投与量 (mg/kg)	腫瘍重量(mg)	生存率(%)
M5076	対照群	0	230±0.18 (100)	0
	DS 4152	30	080±0.09 (37)	33

(a)移植21日目の平均腫瘍重量±標準誤差、(b)は平均生存日数。

(c) (a)投与群のメチアソン生存日数/対照群のメチアソン生存日数-1)×100

れ、可溶性の結晶重量の69~175%であつた。

表11 表

処 理	結 晶 量	
	平均値±標準偏差	T/C%
生理食塩水(90)	Q381± Q191	1000
生理食塩水(10)	Q391± Q122	1000
酢酸コチゾン	Q340± Q162	942
DS 4152 (Q61mg/100ml 90)	Q381± Q070	1000
DS 4152 (Q1mg/100ml 90)	Q261± Q077	723
DS 4152 (Q61mg/100ml 90) +酢酸コチゾン	Q063± Q018	175*
DS 4152 (Q1mg/100ml 90) +酢酸コチゾン	Q028± Q011	74*
DS 4152 (Q61mg/100ml 10)	Q322± Q071	824
DS 4152 (Q1mg/100ml 10)	Q358± Q115	908
DS 4152 (Q61mg/100ml 10) +酢酸コチゾン	Q063± Q036	161**
DS 4152 (Q1mg/100ml 10) +酢酸コチゾン	Q035± Q016	69**

*P<Q0.5, **P<Q0.1 ステューデントt-検定による

試薬を注射用とする。

実施例12

製剤:

DS 4152 6mg、アレドニゾン20mg、乳糖50mg、トウモロコシデンプン150mg、カルボキシメチルセルロースカルシウム5mg、ヒドロキシプロピルセルロース3mg及びステアリン酸マグネシウム0.5mgを常法に従つて混合、打錠し、1錠とする。

4. 図面の簡単な説明

第1図をいし第4図は高速ゲル透過クロマトグラムである。

以 上

実施例10

製剤:

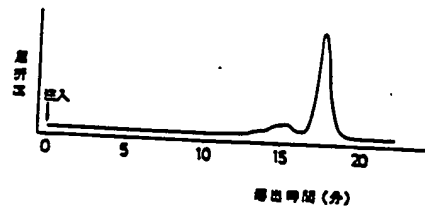
DS 4152 6mg、乳糖300mg、トウモロコシデンプン144mg、カルボキシメチルセルロースカルシウム30mg及びヒドロキシプロピルセルロース20mgを用い、常法に従つて500mgの錠剤を調製した。この錠剤は皮状に包んで1850.0mg~8mgを服用する。

実施例11

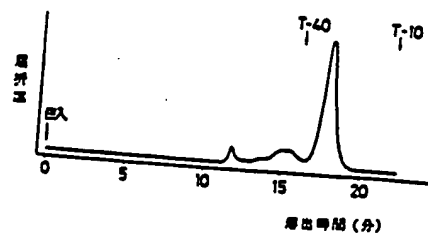
注射剤:

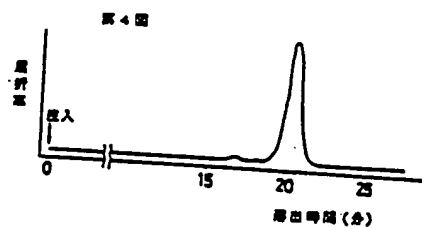
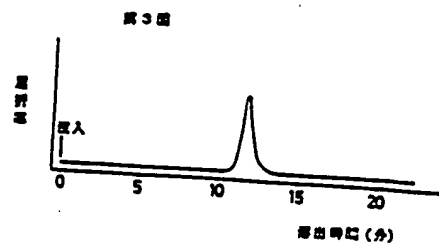
DS 4152 12mg、塩化ナトリウム90mgを注射用蒸留水に溶解し、10mlとする。この溶液をメンブランフィルターで濾過した後、アンプルに充填し、115℃で30分間

第1図



第2図





第 1 頁の続き

④ Int. Cl. 4

A 61 K 31/725

C 08 B 37/02

C 12 P 19/04

// (A 61 K 31/725-31:56)

識別記号

ADU

ABE

庁内整理番号

8615-4C

6779-4C

C-8515-4B

7252-4C

⑤発明者 小河 秀正

東京

東京都江戸川区北葛西 1 丁目 16 番 13 号 第一製薬中央研究所内